DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.020

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0918-04

烟熏小鼠气道重建模型的建立及 TGF-β_1 的表达

樊卫文[1],孙 滨[1],孙秉中[2],倪殿涛[1] (第四军医大学西京医院:[1]呼吸内科;[2]血液内科;西安 710032)

提 要: 目的 建立烟熏小鼠气道重建模型和探讨转化生长因子-β_1(TGF-β_1)在该模型中的表达与意义。**方法** 以烟熏8周建立气道重建动物模型,并检测胶原蛋白、病理形态学等重建指标的改变;采用原位杂交方法,观察 TGF-β_1 在肺脏表达变化。**结果** ①小鼠模型组肺脏中发生明显的气道重建改变;②小鼠模型组肺脏中 TGF-β_1 的表达较正常对照组明显增多,主要存在于气道上皮、粘膜下层和平滑肌细胞中;③TGF-β_1 的表达与肺脏胶原蛋白含量有显著正相关。**结论** 长期(8周)烟熏可建立气道重建模型;TGF-β_1 在慢性气道重建形成中具有重要作用。

关键词: 气道重建;胶原蛋白;转化生长因子-β_1

中图法分类号: R-332;R392.12;R562.25 **文献标识码**: A

Establishment of the mouse model of airway remodelling and the expression of transforming growth factor β_1

FAN Wei-wen, SUN Bin, SUN Bing-zhong, NI Dian-tao (Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To establish a mouse model of airway remodelling, and to investigate the role of transforming growth factor β_1 (TGF-β_1) in airway remodelling. **Methods** A total of 40 male Kunming mice were divided into two groups. The mouse model of airway remodelling was produced by chronic exposure to smoke by burning cigarette slowly. the pathological changes were examined with light and electron microscope. The collagen proteins was detected and the expression of TGF-β_1 in the lung was determined by *in situ* hybridization. **Results** Changes were observed in the airway remodelling in the mouse model, and the expression of TGF-β_1 in the model was higher than that in control group. The expression took place mainly in air tract epithelium, submucosa and smooth muscle cells. There was a significant correlation between the expression of TGF-β_1 and the content of pulmonary collagen proteins. **Conclusion** Inhaling cigarette smoke for 8 weeks can induce the model of airway remodelling, and the TGF-β_1 is involved in the process of airway remodelling.

Key words: airway remodelling; collagen; transforming growth factor β_1

气道重建是慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管哮喘等呼吸系统疾病的病理组织学特点。随着分子生物学方法的进展,近年气道重建的研究越来越受到人们的关注。我们采用长时间(8周)的香烟烟熏刺激制备稳定的气道重建模型,并初步探索其检测指标。转化生长因子(Transforming growth factor, TGF)-β 是致纤维化的重要细胞因子,本实验检测和探讨 TGF-β_1 在气道重建模型中的表达及其意义。

1 材料与方法

1.1 模型建立

健康雄性昆明种小鼠(陕西中医研究所提供)40只,体重16~22 g。随机分为2组:①对照组(1组):20只,不进行烟熏,饲养条件同模型组。②模型组(2组):20只,放置在内径为30 cm的真空干燥器中,盖上留活塞孔作通气用,下面放有一可调小电炉,铺放一支香烟烟丝(宝鸡卷烟厂产无过滤嘴熊猫牌香烟),打开电源使烟丝缓慢燃烧完全,每次烟熏30 min,前2周每天上下午各烟熏1次,以后仅每天下午1次,总共8周。

作者简介:樊卫文(1968-),男,湖南省湘乡市人,博士研究生,主治医师,主要从事 COPD 与哮喘发病机制和防治方面的研究。电话:(029)3375237

收稿日期:2000-12-27;修回日期:2001-03-19

1.2 动物处理

以10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉后开胸,除作支气管肺泡原位灌洗(BAL)的肺外,脊椎脱位法处死动物前后分别测小鼠全重和肺脏重量求肺系数[肺重(mg)/体重(g)][1]。将肺内血液冲洗干净,取气管和肺标本分别进行常规病理检查、透射电镜观察和肺羟脯氨酸测定,并留取冰冻切片作原位杂交。

1.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数及分类

动物麻醉后,每组任意取其中10只固定于板上,切开颈部皮肤,无菌条件下进行支气管肺泡原位灌洗,先向气管内注入生理盐水1 ml,轻揉胸部,吸出液体,共灌洗3次,离心后收集全部细胞,Hanks液洗涤后,用血细胞计数板行细胞计数。部分细胞制成细胞涂片,瑞氏染色后进行细胞分类计数。

1.4 肺胶原蛋白含量测定

动物处死后取小鼠全肺,称重,参照 Woessner 法[2]测定羟脯氨酸含量,了解组织所含胶原蛋白的变化。

1.5 病理标本的制作

两组取相同部位肺组织连同部分支气管和气管留作电镜标本,25 g/L 戊二醛固定,10 g/L 锇酸后固定,常规脱水,Epon812 树脂透入包埋,超薄切片机切片,JEM-2000EX 透射电镜观察。取同部位肺组织40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋,常规切片 HE 染色,光镜观察。

1.6 cDNA 探针制备和标记

将载有猪 TGF-β_1 cDNA 片段的质粒 pCDV1(Dr. Flanders 惠

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

赠)扩增后，用内切酶 *SacⅠ/PvuⅡ* 双酶切下 640 bp TGF-β_1 cDNA 片段。电泳鉴定后，按地高辛标记和检测试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司)进行随机引物法标记探针。

1.7　原位杂交

以 40 g/L 多聚甲醛(pH 7.4)固定肺组织样本 20 min。2×SSC 5 mmol/L EDTA 50 ℃处理 30 min。蛋白酶 K(1 mg/L)37 ℃消化 15 min，2 g/L 甘氨酸处理 10 min，PBS 5 mmol/L $MgCl_2$ 洗 15 min。40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，梯度酒精脱水。42 ℃预杂交 1 h。加含变性探针(1 mg/L)的杂交液并盖上硅化盖玻片，液体石蜡封片，42 ℃杂交 18 h。杂交后梯度 SSC 洗涤，阻断剂封闭 30 min。滴加地高辛抗体(1∶500)室温反应 4 h，NBT 和 BCIP 避光室温下显色 30 min，脱水，脱脂，封片。以未加探针者及继蛋白酶 K 消化后用 RNase 处理作为阴性对照。用图像分析仪 (Quantimet570C, Leica) 将原位杂交切片进行灰度扫描，以对照组灰度为 1，记录出 TGF-β_1 mRNA 表达的相对强度。

1.8　统计学方法

采用 SPLM 软件作 t 检验和直线相关分析。

2　结果

2.1　肺系数、肺胶原蛋白和 TGF-β_1 mRNA 表达强度的比较

气道重建模型组小鼠(2 组)肺系数、肺胶原蛋白含量和 TGF-β_1 mRNA 表达强度均较正常对照组(1 组)明显增加($P<0.01$)，见表 1。

表 1　肺系数、肺胶原蛋白和 TGF-β_1 mRNA 表达强度的比较($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of lung index, collagen proteins and TGF-β_1 mRNA($n=10, \bar{x}\pm s$)

Group	Lung index($mg\cdot g^{-1}$)	Collagen proteins ($mg\cdot g^{-1}$)	TGF-β_1 mRNA
1	6.22 ± 0.31	108.39 ± 17.53	1.21 ± 0.36
2	9.85 ± 0.64*	192.61 ± 25.88*	2.99 ± 0.73*

*：$P<0.01$ *vs* Group 1

2.2　支气管肺泡灌洗液细胞变化

2XEGG 中 BAL 细胞总数及分类中的中性粒细胞较 1 组有显著增加($P<0.01$)，见表 2。

表 2　支气管肺泡灌洗液中细胞数、回收率及分类计数变化($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of total cell count, recovery rate and differential cell count in BALF($n=10, \bar{x}\pm s$)

Group	Total cell count ($\times 10^8\cdot L^{-1}$)	Recovery rate (%)	Differential cell count(%)		
			Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils
1	2.56 ± 0.28	55.15 ± 10.07	69.34 ± 11.62	18.03 ± 2.91	8.16 ± 3.97
2	5.29 ± 1.21*	50.73 ± 12.35	62.58 ± 17.36	15.87 ± 4.10	19.53 ± 6.40*

*：$P<0.01$ *vs* Group 1

2.3　形态学观察

2.3.1　光镜　2 组小鼠肺组织气管、支气管纤毛柱状上皮细胞部分剥脱，纤毛粘连、倒伏、变性和坏死，有的纤毛明显脱落；杯状细胞增生，其中富含粘蛋白颗粒；粘膜层、粘膜下层及肌层炎细胞浸润；可见支气管平滑肌明显增厚；管腔及纤毛导管内充满大量中性粒细胞、肺泡巨噬细胞及粘液分泌物；肺泡扩张，肺泡隔明显增宽，其中可见炎细胞浸润和毛细血管扩张、充血。见图 1；1 组小鼠肺组织气管内上皮细胞完整，4 例鼠粘膜下层可见浆细胞、单核细胞和少量中性粒细胞浸润，其余未见异常。气管和各级支气管上皮纤毛完整纤毛细胞之间见少量杯状细胞，还可见少数散在的淋巴细胞。

2.3.2　电镜　2 组小鼠肺组织各级支气管上皮细胞纤毛明显减少、紊乱，有的变性甚至坏死，横切面“9＋2”结构模糊，见图 2A；上皮细胞表面微绒毛减少，胞浆内线粒体肿胀，有的空泡样变、游离核糖体减少，粘膜下层结缔组织增生，见图 2B；还可见毛细血管基底膜增厚，管腔纤维化甚至闭塞；肺泡壁纤维组织弥漫性增生。1 组小鼠肺组织气管、支气管和肺泡上皮细胞结构正常。纤毛丰富，横切面“9＋2”结构清晰，胞浆内可见丰富的线粒体、核糖体。

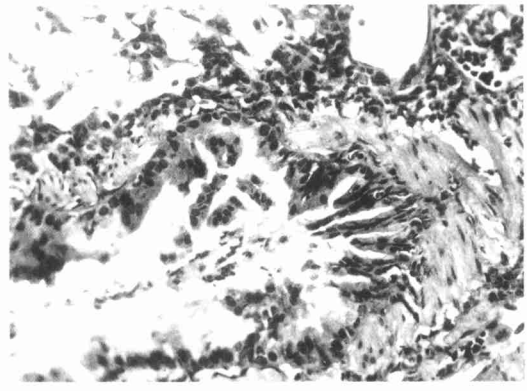


图 1　2 组小鼠肺细支气管病变光镜观察　(HE×360)

Fig 1　Light microscopy of lung and bronchide in Group 2　(HE×360)

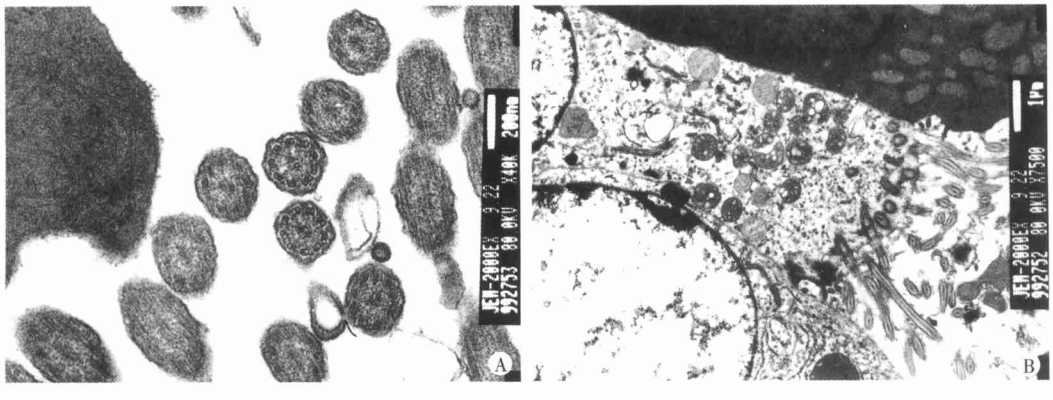


图 2　2 组小鼠肺上皮细胞电镜观察　A：TEM×40 000；B：TEM×7 500

Fig 2　TEM of lung in Group 2　A：TEM×40 000；B：TEM×7 500

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 原位杂交

正常对照组肺组织中 TGF-β_1 基因有一定表达，主要存在于上皮细胞中，见图3。模型组中表达量明显增加，主要存在于气道上皮、粘膜下层和平滑肌细胞，见图4。

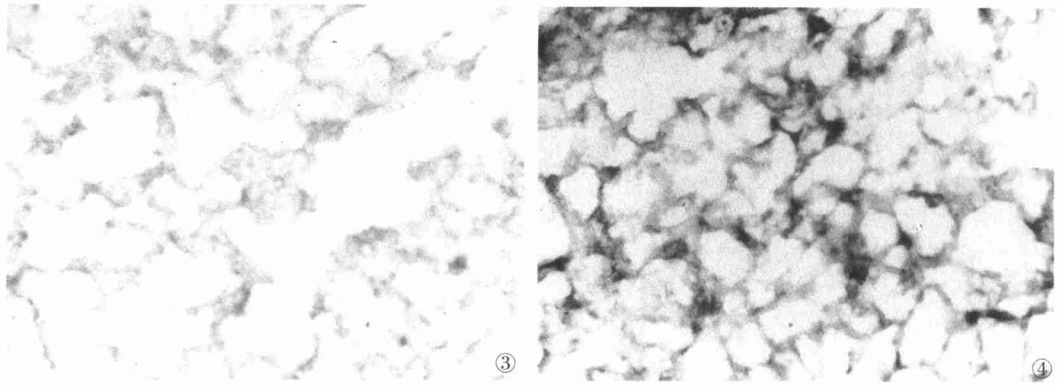


图3 1组肺组织中 TGF-β_1 弱阳性染色 (ISH×360)

Fig 3 The expression of TGF-β_1 in Group 1 (ISH×360)

图4 2组肺组织中 TGF-β_1 强阳性信号增加 (ISH×360)

Fig 4 The expression of TGF-β_1 in Group 2 (ISH×360)

2.5 肺胶原蛋白含量与 TGF-β_1 相关关系分析

TGF-β_1 表达与肺含量呈显著正相关($r=0.701$，$P<0.05$)。

3 讨论

气道重建是 COPD 和支气管哮喘中存在的难以逆转的病理变化，也是肺动脉高压和肺心病形成的病理基础，其主要表现为上皮下纤维化、平滑肌增厚和细胞外基质沉积等。随着世界工业化进程的加速，COPD 等的发病率也在增加，近年气道重建的研究也越来越受到人们的关注。疾病的早期即可发生气道重建的改变，有报道显示卵蛋白致敏的大鼠经过三周的反复吸入卵蛋白气雾剂攻击后气道平滑肌层即显著增厚。Sterk[3] 认为气道重建一旦形成，目前应用的药物包括糖皮质激素都无法逆转。慢性支气管炎或 COPD 动物模型的制备方法有多种多样，常用的简便易行方法是给动物吸入二氧化硫或烟雾等[4]。烟雾在 COPD 的形成中是重要的病因之一，因而用其制备的模型也能相应类似地反映人类疾病的病理形成过程。即使应用烟雾复制模型，熏制时间也各不相同，有的长达 200 多 d[5]，也有短至 20 d[6]。时间过长不仅影响实验的周期，而且也增加费用。模型复制过短虽然可见一些气道炎症的病理性改变，然而慢性气道重建的特征还没完全体现出来。我们采用烟熏 8 周制备的气道重建模型，发现 BALF 中细胞总数及中性粒细胞明显增多，表明气道存在持续的慢性炎症，而且肺脏中所含胶原蛋白明显高于正常对照组，病理形态学也证实其符合气道重建的病理特点：气道平滑肌细胞增殖，上皮下层增厚以及诸如胶原蛋白等细胞外基质的沉积。模型的建立为以后进一步研究奠定了必要的基础。

TGF-β_1 是近年发现的一个具有多种生物学功能的细胞生长因子家族，成熟的 TGF-β_1 为一同源二聚体多肽，在哺乳类动物中有三个亚型(TGF-$\beta_{1\sim3}$)，生物学功能的发挥主要取决于 TGF-β_1。TGF-β 通过其受体发挥作用，可影响细胞的增殖分化，在创伤愈合、胚胎发育、细胞外基质的形成和免疫调节等过程中发挥重要作用。近年的研究表明 TGF-β 在一些疾病纤维化过程中起重要作用，是迄今已知最强的致纤维化因子之一[7]，正常肺组织的 TGF-β_1 多为无活性的存在形式，经蛋白水解酶裂解作用，形成活性二聚体而发挥生物学效应[8]。肺内许多细胞都能分泌 TGF-β_1，如肺泡巨噬细胞、成纤维细胞、气道上皮细胞以及激活的嗜酸细胞等多种细胞。TGF-β_1 可存在于气道上皮、粘膜下层和平滑肌层[9]。Vignola 等[10] 于 1997 年用免疫组化方法对慢性支气管炎和哮喘患者支气管粘膜活检标本研究发现：慢支和哮喘 TGF-β_1 均较健康对照组明显增高，且慢支最为显著，且与基底膜厚度及成纤维细胞数量成显著正相关。我们的研究结果显示，模型组组织 TGF-β_1 表达明显强于对照组，而且其表达强度与肺脏胶原蛋白的含量呈明显正相关，表明：TGF-β_1 可促进胶原的生成，参与了气道重建的发生与发展过程，上述结果也支持 Vignola 等[10] 的研究。本研究提示：TGF-β_1 在一定程度上反映肺脏胶原蛋白含量，可望作为判定气道重建发生及其程度的指标。检测气道重建的发生及程度目前最直接的指标是病理学证据，然而临床工作中非常难以得到，如何寻找一种非损伤性诊断方法，将对此类疾病的诊断和防治有非常重要的意义，这也是国内外研究较为活跃的课题。虽然 Redington[11] 用酶联免疫吸附试验测定哮喘患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中 TGF-β_1 的含量较健康人显著增高；然而，如何应用非损伤性手段(如 BALF、引痰方法等)来反映并判定气道重建发生与程度的指标，有待进一步的深

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

入研究。

参考文献：

[1] Chen X Y, Xi P X, Yan Y Z, *et al*. Protective effect of 764-3 on experimental lung fibrosis in rats[J]. Zhong Guo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao (Acta Academiae Medicinae Sinicae), 1992, 14(4): 263.
[2] Woessner J F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportion of this amino acid[J]. Arch Biochem Biophys, 1961, 93: 440.
[3] Sterk P J. Improving asthma treatment: the physiological message[J]. Eur Respir J, 1994, 7(2): 220 - 222.
[4] Fang F D, Zhou L, Ding L, *et al*. Modern medical experimental skill [M]. Beijing: Beijing medical university and Xiehe medical university combining publishing company, 1997. 268.
[5] Zhang D P, Hu L D, Li H, *et al*. An experimental study of inhaled smoke mice and pathomorphology[J]. Zhong Hua Jie He He Hu Xi Za Zhi (Chinese Journal of Tuberculousis and Respiratory Diseases), 1987, 10(4): 224.
[6] Ren B, Tao Q F, Ma S Y, *et al*. Reproduction of chronic bronchitis animal model and observation of pathomorphology[J]. Tian Jin Yi Yao (Tianjin medicine), 1995, 23(2): 102 - 103.
[7] Sloway J, Garlad A, Kelleher M. Hyperoxia-induced airway remodelling in immature rats: correlation with airway responsiveness[J]. Am Rev Respir Dis, 1992, 145: A14.
[8] Massague J. The transforming growth factor-β family[J]. Annu Cell Biol, 1990, 6: 597 - 641.
[9] Broekelmann T J, Limper A H, Colby T V, *et al*. Transforming growth factor β_1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(15): 6 642 - 6 646.
[10] Vignola A M, Chanez P, Chiappara G, *et al*. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(2 Pt 1): 591 - 599.
[11] Redington A E, Madden J, Frew A J, *et al*. Transforming grwoth factor-beta 1 in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(2 Pt 1): 642 - 647.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2001)08-0921-01

个案与短篇

以胸腔积液为主要表现的急性淋巴细胞白血病1例

Pleural effusion as the first manifestation in a case of acute lymphocytic leukemia

宫立众，张翼军，陈 耿 （第三军医大学附属西南医院血液内科，重庆 400038）

患者男，19岁，因咳嗽、盗汗2月，加重伴气促5 d于1999年9月22日入院。2月前患者无明显诱因出现咳嗽，干咳，夜间为甚，盗汗，院外治疗效果差，并出现咳嗽加剧，胸闷、气促、颜面水肿。胸片及B超检查：胸腔积液、心包积液。血常规正常（院外医生告诉患者），具体不详（未见到检查结果）。予以抗炎、抽液治疗后症状仍无减轻而入我院。查体：T37.8 ℃，P 110次/min，R 22次/min，BP 14.5/11.0 kPa，气管左偏，右侧胸廓饱满，呼吸动度减弱，中下部语颤减弱，叩诊实音，呼吸音低。心浊音界向两侧扩大。血象：Hb 130 g/L，WBC 19.5×10^9/L，PLT 191×10^9/L，W-SCR 0.308，W-LCR 0.692，ESR 42 mm/h，血尿酸954 μmol/L，，胸片：右侧胸腔中量积液，左侧少量积液，心包积液。PPD(+)。胸水：血性，李凡它(++)，细胞总数 111.52×10^9/L，白细胞 21.52×10^9/L，单个核0.70，多核0.30。胸水CEA 7.0 ng/ml，铁蛋白 > 500 ng/ml。脱落细胞学：大量炎细胞（中性粒细胞），未见癌细胞。抗酸杆菌(-)。两次胸水LDH分别为2 992 IU/L，1 698 IU/L。胸膜活检：慢性炎症。予以抗痨、抽液、利尿等治疗。5次共抽胸水3 000 ml，经治疗后自感症状好转出院。6 d后病情加重再次入院，查血象：Hb 90 g/L，WBC 188.3×10^9/L，PLT 42×10^9/L；骨髓：急性淋巴细胞白血病（急淋）L_2 型。停用抗痨治疗，予以“VDCP”方案化疗1个疗程后取得完全缓解，胸水吸收，现正在随访中。

讨论

该患者临床表现为胸腔积液，之后外周血WBC升高，骨髓细胞学为急淋，经联合化疗后取得完全缓解，胸水吸收，胸腔积液的症状完全消失，支持该患者为以胸腔积液为主要表现的急淋病例。急性淋巴细胞白血病临床表现各异，主要与白血病细胞组织浸润有关。急性白血病诊断时可伴有胸腔积液，尤以急淋较为多见[1,2]，但以胸腔积液为首发症状，尚属罕见。

本例病人误诊的原因有：临床表现特殊；未注意患者的血WBC升高，且为进行性升高，未进行血涂片分类；未鉴别结核性胸腔积液和癌性胸腔积液，胸水LDH、CEA、铁蛋白已经提示可能为癌性胸腔积液，若能查胸水的pH值等可能更有帮助；病理误导：高倍镜，HE染色不能区分成熟淋巴细胞和幼稚淋巴细胞，所以病理为“慢性炎症”，又因幼稚淋巴细胞制片时易破碎，形成“蓝细胞”，造成脱落细胞分类时以中性粒细胞为主。

关键词： 胸腔积液；急性淋巴细胞白血病
中图法分类号： R733.710.4 **文献标识码：** B

参考文献：

[1] 沈 迪，王辩明，宋善俊 主编. 临床血液学[M]. 北京：人民卫生出版社，1989. 486 - 487.
[2] 邓家栋 主编. 临床血液学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1985. 669.

（编辑 郭建秀）

作者简介：宫立众（1966-），男，河北省巨鹿县人，博士，主治医师，讲师，主要从事血液内科临床及外周血干细胞移植的实验研究，发表论文10余篇。电话：(023)68755395

收稿日期：2000-01-27；**修回日期：**2000-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net